

Abstrakt

V posledních letech se hmotnostní spektrometrie (MS) stala dominantní technologií používanou při lipidomické analýze a silně ovlivnila výzkum a diagnostiku onemocnění lipidního metabolismu jako např. lysosomální střeďavá onemocnění (LSD) charakterisovaná poruchami funkcí lysosomů. Soubor poruch lysosomální degradace sfingolipidů (SFL) přísluší ke skupině sfingolipidos. Tento stav má vážné až fatální klinické důsledky.

Prvotním cílem práce bylo zavedení kvantitativní a kvalitativní analýzy SFL pro výzkum a diagnostiku LSD. Na jejím počátku bylo třeba připravit semisyntesou lipidní hmotnostně značené standardy pomocí imobilizované sfingolipid ceramid N-deacylasy. Zavedené metody kvantitativní analýzy byly posléze použity k průkazu zvýšené exkrece močových SFL u LSD s charakteristickým střeďáním v ledvinách. Vyhodnocení SFL vylučovaných močí prokázalo svůj význam při diferenciaci diagnostice deficitu prosaposinu a saposinu B kdy rutinní enzymologie selhává. MS navíc umožňuje sledování jednotlivých molekulárních druhů SFL (isoforem), jenž vedlo ke zjištění, že u některých LSD se jejich profil v moči mění. To následně vedlo k vývoji nové screeningové metody v suchém vzorku moče založeném na vyhodnocování profilu isoforem. Další aplikací MS byla analýza pitevnických vzorků tkání nebo buněk u nevyjasněných případů. Fabryho choroba a prosaposinový deficit byly prokázány také analýzou pitevnických vzorků ledvin a myokardu, což potvrdilo praktický význam takového postupu. V myokardu pacienta s Fabryho chorobou bylo také prokázáno zvýšení toxického lyso-SFL. MS vyhodnocení SFL v placentě podpořilo nálezy imunohistochemické analýzy a společně ukázalo na specifickou roli apikálního pólu placentálních endothelií. MS analýza se ukázala užitečná nejen při analýze metabolitů, ale též při měření aktivit lysosomálních enzymů, neboť umožňuje používání přirozených substrátů na rozdíl od fluorimetrických metod. Použitím MS se nám podařilo prokázat nulovou aktivitu β -glukocerebrosidasy v kožních fibroblastech pacienta s Gaucherovou chorobou typu II se závažným "collodion baby" fenotypem. Možnost používat hmotnostně značené substráty při dynamických metabolických experimentech namísto běžně užívaných radioaktivních lipidů byla testována v kulturách kožních fibroblastů pacientů s GM1 gangliosidosou. Bylo prokázáno, že hmotnostně značené substráty jsou vhodnou náhradou radioaktivních analogů, což přispívá k eliminaci rizik při práci s radioaktivními sloučeninami.

V rámci této disertační práce bylo zavedeno široké spektrum metod, které byly otestovány při určování metabolických profilů SFL za normálních a patologických stavů. Naše zjištění potvrdila, že MS lipidomika přináší novou, vyšší úroveň citlivosti analýzy i množství dalších detailních informací. Sledování metabolického osudu jednotlivých molekul může přispět k lepšímu pochopení molekulárních mechanismů onemocnění.